

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 7/24, C12N 1/16	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/21764 (43) 国際公開日 1992年12月10日(10. 12. 1992)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00722 (22) 国際出願日 1992年6月4日(04. 06. 92) (30) 優先権データ 特願平3/134750 1991年6月6日(06. 06. 91) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 久我哲郎(KUGA, Tetsuro)(JP/JP) 〒747 山口県防府市協和町2-2-305 Yamaguchi, (JP) 井上 誠(INOUE, Makoto)(JP/JP) 〒747 山口県防府市自由ヶ丘1-3-6 Yamaguchi, (JP) 井村聡明(IMURA, Toshiaki)(JP/JP) 〒747 山口県防府市協和町1-2 Yamaguchi, (JP) 青山良秀(AOYAMA, Yoshihide)(JP/JP) 〒747 山口県防府市協和町2-2-101 Yamaguchi, (JP) 倉都祥行(KURATSU, Yoshiyuki)(JP/JP) 〒747 山口県防府市協和町2-2-302 Yamaguchi, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), SE(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING ASTAXANTHIN BY FERMENTATION (54) 発明の名称 発酵法によるアスタキサンチンの製造法 (57) Abstract A process for producing astaxanthin industrially efficiently at a low cost by culturing a microorganism which belongs to the genus <i>Pfaffia</i>, is resistant to at least one of citronellol, primaquine and hydroxydiphenyl and can produce astaxanthin in a medium.</p>		

(57) 要約

本発明方法によると、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養することによりアスタキサンチンを工業的に安価に効率よく製造することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB ハルバートス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ハナン
BR ブラジル
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴ
CH スイス
CI ユート・ジホアール
CM カメルーン
CS チェコスロバキア
DE ドイツ
DK デンマーク
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GN ギニア
GB イギリス
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリア
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ

MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SN セネガル
SU ソビエト連邦
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国

明 細 書

発酵法によるアスタキサンチンの製造法

技 術 分 野

本発明は発酵法によるアスタキサンチンの製造法に関する。アスタキサンチンは天然カロチノイドの一種であり、養殖魚類の色調改善剤として有用である。

従 来 の 技 術

従来、ファフィア属微生物を用いるアスタキサンチンの製法としては、例えば、ファフィア属に属し、アンチマイシンA感受性を有する微生物を用いる方法〔Applied and Environmental Microbiology, 55, 116(1989)〕、ファフィア属に属し、 β -イオノン耐性を有する微生物を用いる方法〔同誌, 56, 2944(1990)〕、ファフィア・ロドチーマ ATCC24202 を用いる方法（特公昭63-61907号公報）、ファフィア属微生物をエチルメタンスルホネート、UV照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンで変異処理した変異株を用いる方法〔特表平2-504101号公報(WO 88/08025)〕、ファフィア属に属し、ゲラニオールに耐性を有する微生物を用いる方法〔特開平3-206880号公報(EP 427405)〕、ファフィア属に属し、抗生物質（アンチマイシン、ツニカマイシン、ニスタチン）、チトクロームB阻害剤（アンチマイシン、2-n-ヘプチル-4-ヒドロキシキノリン-N-オキシド）またはテルペノイド合成経路阻害剤（メバロン酸ラクトン）耐性を有する微生物を用いる方法〔特表平4-501053号公報(WO 90/01552)〕等が知られている。

発 明 の 開 示

本発明によると、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物からアスタキサンチンを採取することにより、アスタキサンチンを工

業的に安価に効率よく製造することができる。

また、本発明はファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物の培養物、菌体または菌体処理物を提供する。

本発明における菌体処理物としては、菌体の機械的摩砕処理物、超音波処理物、溶媒処理物、酵素処理物、界面活性剤処理物、乾燥処理物等があげられる。

本明細書において、シトロネロール、プリマキンまたはヒドロキシディフェニールに耐性とは、シトロネロール $220\mu\text{g}/\text{ml}$ 、プリマキン $3.9\text{ g}/\text{l}$ またはヒドロキシディフェニール $33\mu\text{g}/\text{ml}$ に生育できることを意味する。

本発明に用いられる微生物としては、ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有するものであればいずれも用いられる。それらの菌株はファフィア属のアスタキサンチン生産菌を通常の変異手段〔例えば、紫外線照射、変異誘導起剤処理（N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等）等〕により変異させた後、シトロネロール、プリマキンまたはヒドロキシディフェニールを含有する培地上で生育する菌として得ることができる。その微生物の例としては、ファフィア・ロドチーマ（Phaffia rhodozyma）に属する微生物、例えば、ファフィア・ロドチーマ H-8264（以下、H-8264株という）、同 H-8434（以下、H-8434株という）、同 H-8435（以下、H-8435株という）等があげられる。

以下に前記変異株の具体的取得方法について示す。

親株としてファフィア・ロドチーマ ATCC24202（以下、ATCC24202 株という）を用い、該菌株をメタンスルホン酸エチル $0.02\text{ml}/\text{ml}$ で 22°C 、60分間処理した後、親株が生育阻害を示す濃度（ $220\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のシトロ

ネロールを含む最小培地寒天平板（グルコース20g/l、ディフコ社製 yeast Nitrogen Base 7g/l、寒天20g/l）上に塗布した。22℃で、7～10日間培養後、生育してくる変異株のうち、250ml容三角フラスコでの液体培養試験で親株よりアスタキサンチンの生産能が優れている菌株を選んだ。そのうち特に優れている株としてH-8264株を得た。

また、シトロネロールの代わりにプリマキン(3.9g/l)およびヒドロキシディフェニール(33μg/ml)を用いる以外は前記の方法と同様に行って得られた菌株のうち、特にアスタキサンチンの生産性の優れた菌株として、それぞれH-8434株およびH-8435株を得た。

これら変異株の耐性の確認は次の様にして行った。

変異株（H-8264株、H-8434株およびH-8435株）と親株(ATCC24202株)を第1～3表に示す濃度の添加物を含む最小培地寒天平板に塗布し、22℃で培養した。その結果を第1～3表に示す。

第 1 表

シトロネロール (μg/ml)	菌 株	
	ATCC24202	H-8264
無	+	+
添 加	+	+
2 0 0	+	+
2 2 0	—	+

第 2 表

プリマキン (g/l)	菌 株	
	ATCC24202	H-8434
無	+	+
添 加	+	+
3. 9	—	+
6. 5	—	+

第 3 表

ヒドロキシフェニール ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	菌 株	
	ATCC24202	H-8435
無 添 加 3 0 3 3	十 十 一	十 十 十

注) 十 : 生育する
十 : わずかに生育する
一 : 生育しない

前記 3 株はブタベスト条約に基づき、H-8264株は平成 3 年 5 月18日付で、H-8434株とH-8435株は平成 4 年 3 月13日付で、それぞれ工業技術院微生物工業技術研究所に国際寄託され、それぞれFERM BP-3404、3800および3801の寄託番号が付与されている。

本発明に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機塩、生育因子等を程よく含有する培地ならば合成培地または天然培地のいずれでもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、ペプトン、酵母エキス、コーンスティプリカー等が用いられる。無機塩としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化カルシウム等が用いられる。生育因子としては、ビタミン、アミノ酸、核酸関連物質等が用いられる。

培養はバッチ培養、連続培養等が用いられ、温度15～35℃好ましくは20～25℃、pHは 3～8 、好ましくは 4～6 で行われ、通常 2～7 日間で終了する。培地のpHは炭酸カルシウム、無機または有機の酸、アルカリ溶液、アンモニア、pH緩衝液（例えば、フタル酸水素カリウム）などによって調整される。

培養終了後、培養液から菌体（アスタキサンチン含有）またはアスタキサンチンを得るには、例えば、培養終了後、菌体を分離して、そ

れを乾燥粉碎し乾燥菌体を得るか、培養液から菌体を分離し、破碎した後、該破碎菌体からアスタキサンチンを溶媒抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで処理して得る。

本発明によって得られたアスタキサンチン、前記微生物の培養物、菌体、菌体処理物等は魚類、甲殻類の餌料に用いられる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示す。

実施例 1

H-8264株、H-8434株およびH-8435株をそれぞれ試験管中の下記組成からなる種培地 8 mlに植菌した後、22℃で3日間培養した。

種培地組成：グルコース 10 g/l、酵母エキス 3 g/l、ペプトン 5 g/l、肉エキス 3 g/l (pH 5.0、KOHで調整、120℃で20分間加圧蒸気殺菌)

得られた3つの種培養液 3 mlをそれぞれ 250ml容三角フラスコ中の下記組成からなる生産培地 30mlに植菌し、22℃で4日間培養した。

生産培地組成：グルコース 30 g/l、硫酸アンモニウム 2 g/l、酵母エキス 2 g/l、KH₂PO₄ 1 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/l、CaCl₂・2H₂O 0.1 g/l、フタル酸水素カリウム 20.4 g/l (pH 5.0、KOHで調整、120℃で20分間加圧蒸気殺菌)

その結果、H-8264株、H-8434株およびH-8435株の培養液中のアスタキサンチン生成量はそれぞれ 5.8mg/l、5.5mg/lおよび 4.7mg/lであった。

一方、対照として、親株 ATCC24202 株を用い、前記と同様に培養した結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は 3.3mg/l であった。

実施例 2

H-8264株を2リットル容三角フラスコの実施例 1 に示した種培地 300 mlに植菌した後、22℃で3日間培養した。得られた種培養液 300 mlを5リットル容培養槽中の実施例 1 に示した生産培地からフタル酸

水素カリウムを除いた培地 3 リットルに植菌した後、22℃で48時間培養（回転数600rpm、通気量 3 リットル/min）した。培養中のpHは、アンモニア水で5に調整した。その結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は17.1mg/lであった。

この培養液から菌体を分離した後、ホモゲナイザーにて菌体を破碎した。該破碎菌体からアスタキサンチンをアセトンにて抽出し、減圧濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィー（溶出液；アセトン：石油エーテル〔1：19v/v〕→アセトン：石油エーテル〔1：4 v/v〕の濃度勾配）によりアスタキサンチン32mgを得た。

実施例 3

H-8434株を 2 リットル容三角フラスコ中の実施例 1 に示した種培地 300 mlに植菌し、22℃で 3 日間培養した。得られた種培養液80mlを 2 リットル容培養槽中の実施例 1 に示した生産培地からフタル酸水素カリウムを除いた培地 720mlに植菌し、22℃で48時間培養（回転数900 rpm、通気量0.8 リットル/min）した。培養中のpHは、アンモニア水で5に調整した。その結果、培養液中のアスタキサンチン生成量は16.3mg/lであった。

この培養液から菌体を分離した後、スプレー式乾燥機で乾燥することにより、14mgのアスタキサンチンを含む37gの乾燥菌体を得た。

請 求 の 範 囲

- (1) ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にアスタキサンチンを生成蓄積させ、該培養物よりアスタキサンチンを採取することを特徴とする発酵法によるアスタキサンチンの製造法。
- (2) ファフィア属に属し、シトロネロール、プリマキンおよびヒドロキシディフェニールの少なくとも一種に耐性を有し、かつアスタキサンチン生産能を有する微生物の培養物、菌体または菌体処理物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00722

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="margin-top: 10px;">Int. Cl⁵ C12P7/24, C12N1/16</div>														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 25%;">Classification System</th> <th style="width: 75%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC</td> <td style="padding: 10px;">C12P7/24-7/38, C12N1/16</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px; font-size: small;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div> <div style="margin-top: 20px;">Biosis System</div>			Classification System	Classification Symbols	IPC	C12P7/24-7/38, C12N1/16								
Classification System	Classification Symbols													
IPC	C12P7/24-7/38, C12N1/16													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category [*]</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td style="vertical-align: top;">WO, A2, 91/2060 (Igene Biotechn INC.), February 21, 1991 (21. 02. 91), & AU, A, 9055385</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td style="vertical-align: top;">EP, A1, 427405 (Enzymatix LTD.), May 15, 1991 (15. 05. 91), & NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td style="vertical-align: top;">WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 & DK, A, 90/865</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-2</td> </tr> </table>			Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	A	WO, A2, 91/2060 (Igene Biotechn INC.), February 21, 1991 (21. 02. 91), & AU, A, 9055385	1-2	A	EP, A1, 427405 (Enzymatix LTD.), May 15, 1991 (15. 05. 91), & NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880	1-2	A	WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 & DK, A, 90/865	1-2
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
A	WO, A2, 91/2060 (Igene Biotechn INC.), February 21, 1991 (21. 02. 91), & AU, A, 9055385	1-2												
A	EP, A1, 427405 (Enzymatix LTD.), May 15, 1991 (15. 05. 91), & NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880	1-2												
A	WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.), February 22, 1990 (22. 02. 90), & EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 & DK, A, 90/865	1-2												
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">August 26, 1992 (26. 08. 92)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">September 14, 1992 (14. 09. 92)</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">Japanese Patent Office</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer <div style="height: 40px;"></div> </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">August 26, 1992 (26. 08. 92)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">September 14, 1992 (14. 09. 92)</div>	International Searching Authority <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer <div style="height: 40px;"></div>								
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">August 26, 1992 (26. 08. 92)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">September 14, 1992 (14. 09. 92)</div>													
International Searching Authority <div style="margin-top: 10px; text-align: center;">Japanese Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer <div style="height: 40px;"></div>													

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 92/00722

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC)		
Int. Cl. C12P7/24, C12N1/16		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C12P7/24-7/38, C12N1/16	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
Biosis System		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	WG, A2, 91/2060 (Igene Biotechn INC.) 21. 2月. 1991 (21. 02. 91), &AU, A, 9055385	1-2
A	EP, A1, 427405 (Enzymatix LTD.) 15. 5月. 1991 (15. 05. 91), &NO, A, 90/4447 & JP, A, 3-206880	1-2
A	WO, A2, 90/1552 (Igene Biotechn INC.) 22. 2月. 1990 (22. 02. 90), &EP, A1, 436562 & NO, A, 90/1586 &DK, A, 90/865	1-2
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
26. 08. 92	14.09.92	
国際調査機関	権限のある職員	4 B 8 1 1 4
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官 鈴木 恵理子	